

INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

| | |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 21 September 1999 (21.09.99) | |
| International application No. PCT/DE98/03763 | Applicant's or agent's file reference PCT/MDC 9802 |
| International filing date (day/month/year) 14 December 1998 (14.12.98) | Priority date (day/month/year) 12 December 1997 (12.12.97) |
| Applicant RESZKA, Regina et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 12 July 1999 (12.07.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

| | |
|---|--|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer Diana Nissen Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|---|--|

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT IM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

| | | |
|---|---|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT/MDC 9802 | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE 98/ 03763 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 14/12/1998 | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 12/12/1997 |
| Anmelder MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN et al. | | |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- ☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- ☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

- ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☒ keine der Abb.
- ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 25 (teilweise) und 26-33 (ganz) sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen

/DE 98/03763

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | <p>WO 96 20698 A (UNIV MICHIGAN ;LEVY ROBERT J (US); LABHASETWAR VINOD D (US); SONG) 11. Juli 1996 siehe Seite 6, Zeile 13 - Seite 16, Zeile 2 siehe Seite 56, Zeile 13 - Seite 58, Zeile 7 siehe Seite 97, Zeile 2 - Seite 108, Zeile 9 siehe Seite 110, Zeile 14 - Seite 120, Zeile 18</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p> | 1-33 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Juni 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sitch, W

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|--|--|--|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 48/00 | | A3 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/30741 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. Juni 1999 (24.06.99) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/03763 (22) Internationales Anmeldedatum: 14. Dezember 1998 (14.12.98) (30) Prioritätsdaten: 197 56 309.0 12. Dezember 1997 (12.12.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RESZKA, Regina [DE/DE]; Goethestrasse 23, D-16341 Schwanebeck (DE). BERNDT, Antje [DE/DE]; Charlottenstrasse 20, D-16341 Zepernick (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). | | (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 19. August 1999 (19.08.99) | |
| (54) Title: AGENT FOR GENE THERAPY OF TUMOR, NEURODEGENERATIVE, CARDIOVASCULAR AND AUTOIMMUNE DISEASES (54) Bezeichnung: MITTEL ZUR GENTHERAPIE VON TUMORERKRANKUNGEN, NEURODEGENERATIVEN, HERZKREISLAUF- UND AUTOIMMUNERKRANKUNGEN (57) Abstract <p>Disclosed is an agent for gene therapy of tumor, neurodegenerative, cardiovascular and autoimmune diseases, which can be used both in the medical field and in the pharmaceutical industry. The aim of the invention is to provide a totally new starting point for loco-regional therapy of tumors, more particularly liver metastasis, by combined application of liposomes/plasmid DNA complexes having different composition, quantities and concentrations. The essential point of the invention is a pharmaceutical agent comprising the following: one or more genetic materials which are nonencapsulated or encapsulated in PEG, immuno, immuno/PEG, cationic, optionally polymer-modified liposomes; lyophilized or degradable starch particles and/or gelatin and/or polymer particles, i.e. nanoparticles, and a contrast agent containing iodine, gadolinium, magnetite or fluorine.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft Mittel zur Gentherapie von Tumorerkrankungen, neurodegenerativen, Herzkreislauf- und Autoimmunerkrankungen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, völlig neue Ansatzpunkte für eine lokoregionäre Therapie von Tumoren, insbesondere von Lebermetastasen, durch eine kombinierte Anwendung von Liposomen/Plasmid-DNA-Komplexen unterschiedlicher Zusammensetzung, Größe und Beladung zu liefern. Kernpunkt der Erfindung ist ein pharmazeutisches Mittel, umfassend: eine oder mehrere unverkapselte oder in PEG-, Immuno-, Immuno/PEG-, kationischen, ggf. Polymer-modifizierten, Liposomen verkapselte genetische Materialien; lyophilisierte oder abbaubare Stärketeilchen und/oder Gelatine und/oder Polymerpartikel, wie z.B. Nanopartikel und jod-, gadolinium-, magnetit- oder fluor-haltige Kontrastmittel.</p> | | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|-----------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 98/03763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | WO 96 20698 A (UNIV MICHIGAN ; LEVY ROBERT J (US); LABHASETWAR VINOD D (US); SONG) 11 July 1996 see page 6, line 13 - page 16, line 2 see page 56, line 13 - page 58, line 7 see page 97, line 2 - page 108, line 9 see page 110, line 14 - page 120, line 18 --- | 1-33 |
| Y | PAUSER S ET AL: "Evaluation of efficient chemoembolization mixtures by magnetic resonance imaging therapy monitoring: an experimental study on the VX2 tumor in the rabbit liver." CANCER RESEARCH, (1996 APR 15) 56 (8) 1863-7. JOURNAL CODE: CNF. ISSN: 0008-5472., XP002106971 United States see the whole document --- | 1-33 |

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June 1999

Date of mailing of the international search report

07/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/03763

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| Y | DE 43 41 478 A (MAX DELBRUECK CT FUER MOLEKULA) 8 June 1995 see column 1, line 39 - column 2, line 53 --- | 1-33 |
| Y | WO 95 12392 A (UNIV CALIFORNIA) 11 May 1995 see page 7, line 16 - page 12, line 4 --- | 1-33 |
| A | DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ZUSAMMENFASSUNG 90358589, TAKEKOSHI H: "Chemoembolization combined with hepatic arterial induction of endogenous TNF and anticancer agents for hepatocellular carcinoma---a case report." XP002106973 see abstract & GAN TO KAGAKU RYOHO 'JAPANESE JOURNAL OF CANCER AND CHEMOTHERAPY', (1990 AUG) 17 (8 PT 2) 1744-7. JOURNAL CODE: 6T8. ISSN: 0385-0684., --- | |
| A | EP 0 132 142 A (HITACHI CHEMICAL CO LTD) 23 January 1985 --- | |
| P,Y | RESZKA, R. C (1) ET AL: "A new drug carrier application system for an efficient targeted treatment of liver metastases." JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, (FEB., 1998) VOL. 8, NO. 1, PP. 98. MEETING INFO.: SIXTH LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE LES EMBIEZ, FRANCE MAY 28-31, 1998 ISSN: 0898-2104., XP002106972 see the whole document --- | 1-33 |
| P,X | WO 98 47532 A (COCKBAIN JULIAN R M ;NYCOMED IMAGING AS (NO); GEN HOSPITAL CORP (U) 29 October 1998 see page 5, paragraph 2 - page 17, paragraph 1; claims 22,29,30 ----- | 1-33 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE98/03763

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claims 25 (in part) and 26-33 (fully) relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/03763

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|--|--|
| WO 9620698 A | 11-07-1996 | AU 4755696 A CA 2207961 A EP 0805678 A JP 10511957 T | 24-07-1996 11-07-1996 12-11-1997 17-11-1998 |
| DE 4341478 A | 08-06-1995 | WO 9618421 A EP 0797456 A | 20-06-1996 01-10-1997 |
| WO 9512392 A | 11-05-1995 | US 5460830 A US 5462751 A US 5460831 A CA 2174244 A EP 0726767 A JP 9504790 T | 24-10-1995 31-10-1995 24-10-1995 11-05-1995 21-08-1996 13-05-1997 |
| EP 0132142 A | 23-01-1985 | JP 60021764 A | 04-02-1985 |
| WO 9847532 A | 29-10-1998 | AU 7068698 A | 13-11-1998 |

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/DE 98/03763

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie° | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | <p>WO 96 20698 A (UNIV MICHIGAN ; LEVY ROBERT J (US); LABHASETHAR VINOD D (US); SONG)</p> <p>11. Juli 1996</p> <p>siehe Seite 6, Zeile 13 - Seite 16, Zeile 2</p> <p>siehe Seite 56, Zeile 13 - Seite 58, Zeile 7</p> <p>siehe Seite 97, Zeile 2 - Seite 108, Zeile 9</p> <p>siehe Seite 110, Zeile 14 - Seite 120, Zeile 18</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 1-33 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Juni 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sitch, W

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| Y | <p>PAUSER S ET AL: "Evaluation of efficient chemoembolization mixtures by magnetic resonance imaging therapy monitoring: an experimental study on the VX2 tumor in the rabbit liver."</p> <p>CANCER RESEARCH, (1996 APR 15) 56 (8) 1863-7. JOURNAL CODE: CNF. ISSN: 0008-5472., XP002106971</p> <p>United States</p> <p>siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-33 |
| Y | <p>DE 43 41 478 A (MAX DELBRUECK CT FUER MOLEKULA) 8. Juni 1995</p> <p>siehe Spalte 1, Zeile 39 - Spalte 2, Zeile 53</p> <p>---</p> | 1-33 |
| Y | <p>WO 95 12392 A (UNIV CALIFORNIA)</p> <p>11. Mai 1995</p> <p>siehe Seite 7, Zeile 16 - Seite 12, Zeile 4</p> <p>---</p> | 1-33 |
| A | <p>DATABASE MEDLINE</p> <p>FILE SERVER STN KARLSRUHE</p> <p>ZUSAMMENFASSUNG 90358589,</p> <p>TAKEKOSHI H: "Chemoembolization combined with hepatic arterial induction of endogenous TNF and anticancer agents for hepatocellular carcinoma--a case report."</p> <p>XP002106973</p> <p>siehe Zusammenfassung</p> <p>& GAN TO KAGAKU RYOHO 'JAPANESE JOURNAL OF CANCER AND CHEMOTHERAPY!', (1990 AUG) 17 (8 PT 2) 1744-7. JOURNAL CODE: 6T8. ISSN: 0385-0684.,</p> <p>---</p> | |
| A | <p>EP 0 132 142 A (HITACHI CHEMICAL CO LTD)</p> <p>23. Januar 1985</p> <p>---</p> | |
| P,Y | <p>RESZKA, R. C (1) ET AL: "A new drug carrier application system for an efficient targeted treatment of liver metastases."</p> <p>JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, (FEB., 1998) VOL. 8, NO. 1, PP. 98. MEETING INFO.: SIXTH LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE LES EMBIEZ, FRANCE MAY 28-31, 1998 ISSN: 0898-2104., XP002106972</p> <p>siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-33 |
| P,X | <p>WO 98 47532 A (COCKBAIN JULIAN R M ;NYCOMED IMAGING AS (NO); GEN HOSPITAL CORP (U) 29. Oktober 1998</p> <p>siehe Seite 5, Absatz 2 - Seite 17, Absatz 1; Ansprüche 22,29,30</p> <p>-----</p> | 1-33 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/ 03763

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 25 (teilweise) und 26-33 (ganz) sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03763

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9620698 A | 11-07-1996 | AU 4755696 A | 24-07-1996 |
| | | CA 2207961 A | 11-07-1996 |
| | | EP 0805678 A | 12-11-1997 |
| | | JP 10511957 T | 17-11-1998 |
| DE 4341478 A | 08-06-1995 | WO 9618421 A | 20-06-1996 |
| | | EP 0797456 A | 01-10-1997 |
| WO 9512392 A | 11-05-1995 | US 5460830 A | 24-10-1995 |
| | | US 5462751 A | 31-10-1995 |
| | | US 5460831 A | 24-10-1995 |
| | | CA 2174244 A | 11-05-1995 |
| | | EP 0726767 A | 21-08-1996 |
| | | JP 9504790 T | 13-05-1997 |
| EP 0132142 A | 23-01-1985 | JP 60021764 A | 04-02-1985 |
| WO 9847532 A | 29-10-1998 | AU 7068698 A | 13-11-1998 |

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT 5630

(PCT Article 36 and Rule 70)

09/581366

| | | |
|--|---|---|
| Applicant's or agent's file reference PCT/MDC 9802 | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/DE98/03763 | International filing date (day/month/year) 14 December 1998 (14.12.98) | Priority date (day/month/year) 12 December 1997 (12.12.97) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 48/00 | | |
| Applicant MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN | | |

| | |
|--|--|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p> | |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p> | |

| | |
|---|--|
| Date of submission of the demand 12 July 1999 (12.07.99) | Date of completion of this report 02 December 1999 (02.12.1999) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE98/03763

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-19, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-33, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/1, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE98/03763

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 25-33

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 25-33 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See Supplemental Box

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 98/03763

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|-------------------------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 1-33 | YES |
| | Claims | | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 1-33 | YES |
| | Claims | | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-24 (25-33 - cf. text) | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: Cancer Res. 56, 1863-1867 (1996),

D2: DE-A-4341478,

D3: WO 98/47532 - **P document**,

D4: Abstr. XP002106972 - **P document**.

- Document D1 is concerned with treating liver tumours by means of chemotherapy. A composition consists of cisplatin, an embolisate such as "spherex" (degradable starch pellets with a diameter of 30-50 micrometers) or "gelfoam" (particle diameter 90 micrometers) and Gd-DPTA for amplifying signals in nuclear resonance imaging.

Document D2 discloses liver tumour therapy and a composition that has been prepared from an antitumour agent (cisplatin), an embolisate composed of lyophilised starch particles (40-90 micrometer diameter, for example, "spherex") and an iodine-, Gd-, or magnetite-containing contrasting agent.

Should the priority of the application (not examined) prove to be invalid, then P documents D3

and D4 could be referred to for an objection concerning novelty and inventive step.

The remaining documents merely appear to represent technical background.

2. The application substantially relates to a pharmaceutical agent comprising:
 - *genetic material* (unencapsulated or encapsulated in modified liposomes),
 - starch particles and/or gelatine/polymer particles,
 - contrasting agent (iodine-, gadolinium-, magnetite- or fluorine-containing).
3. In view of the aforementioned remarks, the subject matter of Claims 1 to 33 appears to be novel and inventive.
4. The PCT does not contain any clear criteria for determining whether the subjects of the present Claims 25 to 33 are industrially applicable. Patentability can also depend on the wording of the claims. The EPO, for instance, does not recognise the subject matter of claims relating to the medical use of a compound as industrially applicable; however, claims are allowed which relate to a known compound for first-time medical use and the use of this compound for preparing a drug for a new medical use.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

5. Claims 25 to 33 relate to a subject matter which, in the Examining Authority's opinion, comes under PCT Rule 67.1(iv). Therefore, it is not possible to establish an expert opinion as regards the industrial applicability of the subject matter of those claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).



VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 06 DEC 1999

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

| | | |
|---|---|--|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT/MDC 9802 | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416) | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03763 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 14/12/1998 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 12/12/1997 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K48/00 | | |
| Anmelder MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN et al. | | |



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

| | |
|--|---|
| Datum der Einreichung des Antrags 12/07/1999 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 02.12.99 |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter Ludwig, G Tel. Nr. +49 89 2399 8698  |



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03763

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-19 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-33 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/1 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 25-33.

Begründung:



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03763

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 25-33 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

siehe Beiblatt

- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):

- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

| | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-33 |
| | Nein: Ansprüche |
| Erfinderische Tätigkeit (ET) | Ja: Ansprüche 1-33 |
| | Nein: Ansprüche |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche 1-24 (25-33 - cf. text) |
| | Nein: Ansprüche |

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: Cancer Res. 56, 1863-1867 (1996)
- D2: DE-A-4341478
- D3: WO 98/47532 - **P-Dokument**
- D4: Abstr. XP002106972 - **P-Dokument**

Punkt V:

1. Dokument D1 betrifft die Chemotherapie von Lebertumoren mit einer Zusammensetzung bestehend aus Cis-platin, einem Embolisat wie "Spherex" (abbaubare Stärkekügelchen mit Durchmesser 30-50 Mikron) oder "Gelfoam" (Partikeldurchmesser 90 Mikron) und Gd-DPTA zur Signalverstärkung bei der Kernresonanzbildgebung.

Dokument D2 offenbart eine Tumorthherapie der Leber mit einer Zusammensetzung zubereitet aus einem Cytostatikum (Cis-platin), einem Embolisat aus lyophilisierten Stärkepartikeln (40-90 Mikron Durchmesser z.B. "Spherex") und einem Jod-, Gd-, oder Magnetit-haltigen Kontrastmittel.

Falls die Priorität der Anmeldung (nicht geprüft) *nicht* gültig ist könnten die P-Dokumente D3 und D4 für einen Einwand gegen die Neuheit/erfinderische Tätigkeit herangezogen werden.

Der Rest der Dokumente scheint nur technischen Hintergrund zu betreffen.

2. Die Anmeldung betrifft im wesentlichen ein pharmazeutisches Mittel, umfassend:
 - *genetisches Material* (unkapselt oder in modifizierten Liposomen verkapselt)
 - Stärkepartikel und/oder Gelatine-/ Polymer-Partikel
 - Kontrastmittel (Jod-, Gadolinium-, Magnetit- oder Fluor-haltig).
3. Im Licht des Obigen erscheint der Gegenstand der Ansprüche 1-33 als neu und erfinderisch.



4. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 25-33 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Punkt III:

5. Die Ansprüche 25-33 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34 4) (a) (i) PCT).



72

PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|---|--|--|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 48/00 | | A2 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/30741 |
| | | | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. Juni 1999 (24.06.99) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/03763 | | (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). | |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 14. Dezember 1998 (14.12.98) | | Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> | |
| (30) Prioritätsdaten: 197 56 309.0 12. Dezember 1997 (12.12.97) DE | | | |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-DELBÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). | | | |
| (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RESZKA, Regina [DE/DE]; Goethestrasse 23, D-16341 Schwanebeck (DE). BERNDT, Antje [DE/DE]; Charlottenstrasse 20, D-16341 Zepernick (DE). | | | |
| (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). | | | |
| (54) Title: AGENT FOR GENE THERAPY OF TUMOR, NEURODEGENERATIVE, CARDIOVASCULAR AND AUTOIMMUNE DISEASES | | | |
| (54) Bezeichnung: MITTEL ZUR GENTHERAPIE VON TUMORERKRANKUNGEN, NEURODEGENERATIVEN, HERZKREISLAUF- UND AUTOIMMUNERKRANKUNGEN | | | |
| (57) Abstract | | | |
| <p>Disclosed is an agent for gene therapy of tumor, neurodegenerative, cardiovascular and autoimmune diseases, which can be used both in the medical field and in the pharmaceutical industry. The aim of the invention is to provide a totally new starting point for loco-regional therapy of tumors, more particularly liver metastasis, by combined application of liposomes/plasmid DNA complexes having different composition, quantities and concentrations. The essential point of the invention is a pharmaceutical agent comprising the following: one or more genetic materials which are nonencapsulated or encapsulated in PEG, immuno, immuno/PEG, cationic, optionally polymer-modified liposomes; lyophilized or degradable starch particles and/or gelatin and/or polymer particles, i.e. nanoparticles, and a contrast agent containing iodine, gadolinium, magnetite or fluorine.</p> | | | |
| (57) Zusammenfassung | | | |
| <p>Die Erfindung betrifft Mittel zur Gentherapie von Tumorerkrankungen, neurodegenerativen, Herzkreislauf- und Autoimmunerkrankungen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, völlig neue Ansatzpunkte für eine lokoregionäre Therapie von Tumoren, insbesondere von Lebermetastasen, durch eine kombinierte Anwendung von Liposomen/Plasmid-DNA-Komplexen unterschiedlicher Zusammensetzung, Größe und Beladung zu liefern. Kernpunkt der Erfindung ist ein pharmazeutisches Mittel, umfassend: eine oder mehrere unverkapselte oder in PEG-, Immuno-, Immuno/PEG-, kationischen, ggf. Polymer-modifizierten, Liposomen verkapselte genetische Materialien; lyophilisierte oder abbaubare Stärkepartikel und/oder Gelatine und/oder Polymerpartikel, wie z.B. Nanopartikel und jod-, gadolinium-, magnetit- oder fluor-haltige Kontrastmittel.</p> | | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | | | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | ML | Mali | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MN | Mongolei | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MR | Mauretanien | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MW | Malawi | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | MX | Mexiko | | |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CM | Kamerun | | | PL | Polen | | |
| CN | China | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CU | Kuba | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CZ | Tschechische Republik | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| DE | Deutschland | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DK | Dänemark | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| EE | Estland | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

Mittel zur Genterapie von Tumorerkrankungen, neurodegenerativen, Herzkreislauf- und Autoimmunerkrankungen

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Mittel zur Genterapie von Tumorerkrankungen, neurodegenerativen, Herzkreislauf- und Autoimmunerkrankungen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Dickdarm- und Mastdarmtumoren sind nach den Bronchialkarzinomen bei Männern und Mammatumoren bei Frauen die häufigsten bösartigen (malignen) Tumoren in Deutschland. Die wesentliche therapeutische Maßnahme besteht bei diesen Patienten in der radikalen Resektion des tumortragenden Darmabschnitts. Die Hauptsache für die hohe Mortalität bei kolorektalen Karzinomen ist aber die Metastasierung (a. 1. Stelle Lebermetastasierung). Wenn keine metastasen-chirurgische Behandlung mehr möglich ist, bleibt in aller Regel eine intensive Chemotherapie als letztes Mittel der Wahl.

Trotz intensivster Erforschung neuer potenter Chemotherapeutika ist die Behandlung nicht resektabler Tumoren, insbesondere von Lebermetastasen, weiterhin problematisch, denn kolorektale Karzinome verfügen über eine geringe Zellproliferationsrate, Tumorpheterogenität und Medikamentenresistenz. Ein anderer Grund für das häufige Versagen der Chemotherapie liegt darin, daß die gegenwärtig verfügbaren Zytostatika weder selektiv an bestimmten Stoffwechselwegen von Tumoren angreifen, noch ausschließlich gegen Tumorzellen gerichtet sind. Folglich geht der Einsatz von Zytostatika mit vielen schweren Nebenwirkungen einher.

Hier bietet der Einsatz von Liposomen und Polymeren die Möglichkeit, modifiziert in die pharmakologischen Eigenschaften der Chemotherapeutika einzugreifen.

Trotz jahrzehntelanger intensiver Bemühungen, Patienten mit inoperablen Tumoren mit Hilfe der Chemotherapie zu heilen, sind die Fortschritte als gering zu bezeichnen. Mit Ausnahme einiger weniger Erkrankungen (z.B.: akute lymphatische Leukämie) ist eine vollständige Heilung des Patienten durch alleinige chemotherapeutische Maßnahmen nicht möglich. In vielen Fällen ist auch keine signifikante Erhöhung der Lebenserwartung festzustellen. Dies liegt einerseits an der geringen Tumorspezifität vieler Chemotherapeutika und andererseits an der relativ hohen Toxizität dieser Substanzen. In der Folge ist häufig, trotz massiver Nebenwirkungen, kein ausreichender Wirkspiegel im Tumor zu beobachten. In 28 verschiedenen Studien wurden insgesamt 663 Patienten mit 22 verschiedenen Substanzen behandelt. Nur 6 Patienten zeigten eine komplette Tumorregression, 63 eine temporäre, die jedoch in den meisten Fällen nicht zu einer signifikanten Prolongation der Überlebenszeit führte. Diese Studien belegen eindeutig die Notwendigkeit, bestehende Therapiekonzepte zu verbessern und gegebenenfalls neue Ansätze zu entwickeln.

Liposomen werden seit 23 Jahren u.a. wegen ihrer Ähnlichkeit zu Zellmembranen als multifunktionelles Träger- und Transportsystem für biologisch aktive Substanzen, einschließlich pro- und eukaryontischer Gene untersucht. (Kim S., Drugs, 1993, 46:618-638). Sie lassen sich als geschlossene mikroskopische Strukturen charakterisieren, die aus konzentrisch geordneten Lipiddoppelschichten bestehen, die ihrerseits wäßrige Kompartimente voneinander abtrennen. Besonders umfangreich sind die Arbeiten zur liposomalen Verkapselung von Arzneimitteln. Hier bieten die Liposomen im Vergleich zu anderen Trägersystemen Vorteile, die sich u.a. auch für die Verkapselung von DNA-Konstrukten ausnutzen lassen.

- Wählbarkeit der Zusammensetzung, Ladung, Größe und Stabilität je nach Fragestellung.

- Möglichkeit des vollständigen biologischen Abbaus.
- kaum vorhandene immunologische und toxische Reaktionen.
- Häufig veränderte Pharmakokinetik der liposomal verkapselten Substanz.
- Veränderte Organverteilung und Tropie zu bestimmten Organen.
- Möglichkeiten für verschiedene Methoden des Targetings (Antikörper, Lectine)

Liposomen können auch als Gentransfer-Systeme verwendet werden.

In der Mehrzahl der tierexperimentellen Modelle wurde der Gentransfer jedoch ex vivo durchgeführt. Die hierdurch gewonnenen Erkenntnisse über eine durch die genmodifizierten Tumorzellen induzierte tumorspezifische Immunantwort hat zu der Strategie einer 'Vakzinierung' mit Zytokin-Gentransfizierten Tumorzellen geführt. Eine In-vivo-Gentransfer-Strategie wurde im Rahmen einer RAC-genehmigten Studie im University of Michigan Medical Center, Ann Arbor angewandt. Durch die direkte Injektion von Liposomen/Plasmid-DNA-Komplexen im Tumorgewebe soll der Transfer eines MHC-Klasse-I (HLA-B7)-Gens in Tumorzellen erreicht werden, um dadurch eine Immunreaktion zu stimulieren. Andere Gentransfersysteme benutzen Suizid-Gene, um Tumorzellen für chemotherapeutische Substanzen sensitiv zu machen. Dabei sind verschiedene Gene getestet worden, die ein selektives Abtöten der exprimierten Zellen verursachen können.

Ein einfaches und nach den ersten klinischen Daten auch wirkungsvolles System wurde von K. Culver entwickelt (Culver K.W. et al., Science 1992, 256:1550) und bereits in klinischen Studien angewandt. Die Strategie basiert auf dem Transfer des Herpes-Simplex-thymidinkinase (HSV-tk)-Gens in Tumorzellen mittels eines retroviralen Vektors. HSV-tk-transfizierte Zellen werden für die Anti-Virus-Substanz Ganciclovir sensitiv. Ganciclovir wird durch HSV-tk in einem Nukleotid-ähnlichen Precursor, der nach weiterer

Phosphorylierung in die DNA teilender Zellen inkorpiert wird und zu einem Stopp der DNA-Synthese und zum Zelltod führt.

Caruso et al. (Proc. natl. Acad. Sci., 1993, 90:7024-7028) konnten durch Adaptation der Culver-Suicidstrategie an das Lebermetastasemodell nach Injektion von HSV-tk-Vektorproduzierenden Zellen eine Regression von etablierten, makroskopisch sichtbaren Lebermetastasen nachweisen. Nachteilig für diesen Ansatz der Tumorthherapie mit viralen Vektoren ist aber, daß auf Grund der immunologischen Abwehrmechanismen des Organismus, nur eine einmalige Gabe des Gen-Vektor-Konstruktes möglich ist. Für einen liposomalen Vektor ist eine mehrmalige systemische Verarbeitung möglich.

Auch für die Behandlung von relativ schwer zugänglichen Tumoren (z.B. multiple Lebermetastasen, Gehirntumore) ist die gezielte und sichere Applikation und Transfektion mit retro- bzw. adenoviralen Vektoren noch problematisch, ganz abgesehen von den auftretenden Behandlungsrisiken mit viralen Infektionen. Es soll möglichst wenig gesundes Gewebe zerstört und in Mitleidenschaft gezogen werden, bei möglichst hoher Transfereffizienz mit anschließender vollständiger Tumorregression.

Bisher wurde in vivo noch kein liposomal verpacktes Therapie- oder Suizid-Gen in Lebermetastasen am CC531 Karzinom transfiziert.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, völlig neue Ansatzpunkte für eine lokoregionäre Therapie von Tumoren, insbesondere von Lebermetastasen, durch eine kombinierte Anwendung von Liposomen/Plasmid-DNA-Komplexen unterschiedlicher Zusammensetzung, Größe und Beladung zu liefern.

Die Aufgabe der Erfindung wird durch die in den Ansprüchen 1, 23 und 25 beschriebenen Merkmale gelöst; die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Kernpunkt der Erfindung ist ein pharmazeutisches Mittel, umfassend

- eine oder mehrere unverkapselte oder in PEG-, Immuno-, Immuno/PEG-, kationischen, ggf. Polymer-modifizierten, Liposomen verkapselte genetische Materialien,
- lyophilisierte oder abbaubare Stärkepartikel und/oder Gelatine und/oder Polymerpartikel, wie z.B. Nanopartikel und
- jod-, gadolinium-, magnetit- oder fluor-haltige Kontrastmittel.

Genetische Materialien sind bevorzugt DNA, RNA, Ribozyme, Antisense-Oligonukleotide und besonders bevorzugt Therapiegene, wie z.B. Suizidgene, Zytokingene, Chemokingene (MIP1 α , MCP) Antiangiogenesegene, wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Apoptosegene, wie z.B. Apoptin, Natural born Killer (NbK), ggf. in Kombination mit Markergenen, wie z.B. Green Fluorescence Protein (GFP), Galactosidasegen (LacZ) unter ggf. induzierbaren, ggf. gewebespezifischen Promotoren.

Eine weitere Variante des Mittels besteht darin, daß es zusätzlich, die DNA dichter packende Proteine, wie Nuclear Capsid Protein (NCP 7), HMG und/oder synthetische Substanzen, wie z.B. Polyethylenimin, Poly-L-Lysin oder Protaminsulfat enthält.

Bevorzugte Suizidgene sind Herpes simplex Virus Thymidinkinasegen (HSVtk), Deaminasegen, NR/CB1954, Pyrin Nukleosid Phosphorylase und/oder die Zytokingene IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 und/oder IL-15.

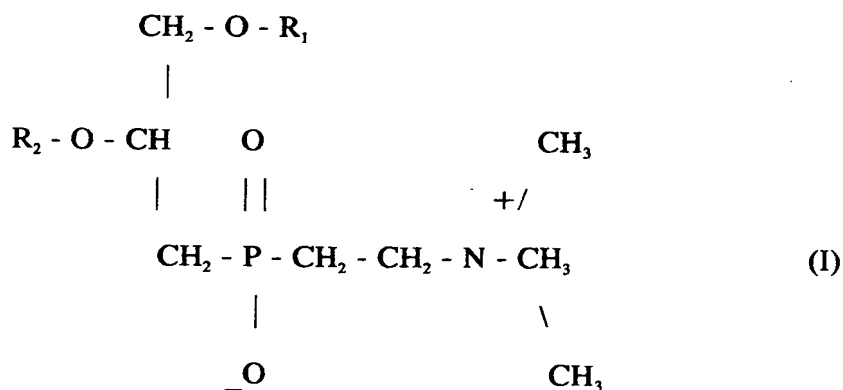
Die Liposomen bestehen aus

- a) einem natürlichen, halbsynthetischen oder voll-synthetischen Amphiphil
- b) einem Steroid,
- c) einer geladenen Lipidkomponente,

- d) dem wasser- oder lipidlöslichen genetischen Material und/oder
 e) einer Trägerflüssigkeit und ggf. zusätzlichen Hilfsstoffen.

Dabei sind die Mengenverhältnisse a:b:c bevorzugt im Molverhältnis 1:0,3:0,1 bis 1:1:0,1 oder bis 1:1:0,5 und c:d im Molverhältnis 2:1 bis 10:1.

Das natürliche, halbsynthetische oder vollsynthetische Amphiphil ist bevorzugt ein Lipid, Tensid, Emulgator, Polyethylenglykol (PEG) oder Lipid-PEG, wobei das Amphiphil eine Verbindung der allgemeinen Formel I ist



worin R_1 und $\text{R}_2 = \text{C}_{10} - \text{C}_{20}$ - Alkanoyl, - Alkenoyl, - Alkyl, -Alkenyl bedeuten.

Das eingesetzte Steroid ist Cholesterol, Diethoxycholesterol oder Sitosterol.

Die geladene Lipidkomponente ist das Anion des Dicetylphosphats, der Palmitinsäure, der Stearinsäure, das Anion eines Phospholipids, wie z.B. Phosphatidylserin, Phosphatidsäure oder das Anion eines Sphingolipids, wie z.B. Sulfatid, oder Polyethylenglykol (PEG), wie z.B. MPEG-DSPE.

Eine bevorzugte Ausführungsform des Mittels besteht darin, daß die geladene Lipidkomponente fluoriert ist.

Weiterhin können als zusätzliche Hilfsstoffe Polymerpartikel in Form einer 25 %igen wäßrigen Lösung von Poloxamer eingesetzt werden.

Bevorzugt liegen die die genetischen Materialien in

- SUV (Small unilamellar vesicles)-PEG-Liposomen,
- LUV (Large unilamellar vesicles)-PEG-Liposomen,
- REV (Reversed face evaporation vesicles)-PEG-Liposomen,
- MLV (Multilamellar vesicles)-PEG-Liposomen,
- Anti-Ki-67-Immun-PEG-Liposomen,
- Anti-CEA-PEG-Liposomen oder
- PEG DAC-Chol-Liposomen vor.

Die Stärkepartikel im Mittel liegen bevorzugt lyophilisiert in einer Größe von 40-90 μm vor und befinden sich in physiologischer Kochsalzlösung in der Konzentration von 5 bis 70 mg/ml.

Besonders bevorzugt weisen die Stärkepartikel eine Korngröße von 60 bis 90 μm auf.

Das erfindungsgemäße Mittel enthält als jodhaltiges Kontrastmittel ein- oder mehrfach jodierte Phenylderivate, darunter bevorzugt Iopromid, Ioxitalamat, Ioxaglat, Iopamidol, Iohexol, Iotralon, Metrizamid oder Ultravist.

Fluorierte Lipide kommen als Kontrastmittel ebenfalls in Betracht.

Eine sehr geeignete Ausführungsform ist ein Mittel, welches 30 bis 90 mg lyophilisierte oder abbaubare Stärkepartikel und 5 bis 100 mg verkapseltes oder unverkapseltes genetisches Material enthält.

Eine spezielle bevorzugte Ausführungsform des Mittels ist dadurch gekennzeichnet, daß es

- Markergen LacZ und Suizidgen pUT HSVtk,
- verkapselt in MLV-PEG,
- als Stärkepartikel Spherex oder Gelfoam und
- ein fluoriertes Kontrastmittel enthält.

Die Mittel werden hergestellt, indem man 30 bis 90 mg lyophilisierte oder abbaubare Stärkepartikel und/oder Gelatine und/oder Polymerpartikel in 3 bis 6 ml Kontrastmittel löst und danach die therapeutisch notwendige Menge eines genetischen Materials zusetzt.

Bevorzugt wird die therapeutische Menge eines genetischen Materials und ggf. ein komplexierendes Agens in einem oder mehreren Lipiden gelöst und mit Stärkepartikeln und einem Kontrastmittel versetzt.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Mittel erfolgt zum Gentransfer und zur Gentherapie, insbesondere zur Therapie von Lebermetastasen, Tumoren der Lunge, Blase, Kopf und Hals, Urogenitalien, Lymphknoten, Mamma, bei Glioblastomen, Arthritis und Asthma.

Es kann gleichermaßen zur lokalen Gentherapie verwendet werden.

Speziell wird das Mittel verwendet

- zur intraarteriellen Therapie von Lebermetastasen, Pankreastumoren, Metastasen im kleinen Becken,
- zur Behandlung von neurodegenerativen und Autoimmunerkrankungen,
- bei Parkinsonscher, Alzheimer Krankheit und Multipler Sklerose,
- bei Diabetes Typ I,
- zur Begleitung von Transplantationen,
- zur Restenosebehandlung und
- bei Bluthochdruck.

Zusammengefaßt wird noch einmal festgestellt, daß für die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Liposomen/Plasmid-DNA-Komplexe folgende Zusammenhänge von entscheidender Bedeutung sind.

1. Die Anwendung der arteriellen Embolisations-therapie; (direkter Zugang zur Tumorversorgung (75-90%), hohe lokale Tumorkonzentration bei geringer systemischer Toxizität)
2. Die kombinierte Anwendung von DNA tragenden Liposomen mit dem Embolisat; (dreifaches Trägersystem)
3. Die Verwendung eines effektiven (starken) Promoters.

Als besonderer Vorteil ist hervorzuheben, daß der Organismus bei der Anwendung dieser Liposomen/Plasmid-DNA-Komplexe kaum eine immunologische Reaktion zeigt (wiederholter Einsatz ist uneingeschränkt möglich), es konnte darüber hinaus keine Toxizität festgestellt werden.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele erläutert werden.

Methode:

In vivo Untersuchung zur Behandlung von Lebermetastasen im Tiermodell.

Es werden multilamellare Polyethylenglykol-Liposomen (MLV-PEG-Liposomen) mit DNA (Suizidgen) beladen und zusammen mit dem Drug Carrier Embolisation System (DCES) intraarteriell zur Behandlung von Lebermetastasen der Ratte eingesetzt.

Tiere:

Für die tierexperimentelle Untersuchungen werden männliche Wag/Rij Ratten verwendet (Zuchtbetrieb: Harlan Winkelmann GmbH, Gartenstrasse 27, D-33178 Borcheln). Das durchschnittliche Körpergewicht (KGW) der Tiere beträgt 250-280g. Die Tierhaltung entspricht den Richtlinien des Tierschutzgesetzes, d.h. die spezifisch pathogen freien (SPF) Ratten werden unter standardisierten Umweltbedingungen im transgenen Trakt des Tierlaboratoriums im Max-Delbrück-Centrum, Berlin-Buch gehalten. Im Tierstall beträgt die Temperatur 22°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), die relative Luftfeuchtigkeit liegt bei 50% ($\pm 10\%$) und der Hell-Dunkel-Rhythmus (6.00-18.00Uhr)

wechselt alle 12h. In einem standardisierten Käfig (Typ 3) mit 810cm² Bodengrundfläche und einer Höhe von 19cm werden die Ratten zu je 2 Tieren auf einer Einstreu aus Sägespäne gehalten (autoklaviert bei 121°C für 12min). Als Standardfutter erhalten die Tiere Versuchstierdiät für Ratten der Firma Sniff sowie Wasser ad libitum.

Zellkultur:

Die CC531 Zelllinie wird in RPMI 1640 Medium kultiviert. Das Medium enthält 10% fötales Kälberserum, 100U/ml Penizillin G, 100µg/ml Streptomyzinsulfat und 0,25µg/ml Amphotericin. Die Zellen werden inkubiert im Zellinkubator bei 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und bei 37°C.

Herstellung der Liposomen:

Hydrogenisiertes Soja-phosphatidylcholin, Cholesterol, Polyethylenglykol wird im molaren Verhältnis von 1:1:0,1 in Chloroform gelöst. Im Rotationsverdampfer wird aus dieser Lösung Chloroform vollständig abgedampft und ein Lipidfilm entsteht. Der Lipidfilm wird mit Aqua dest. über 12h unter Schütteln inkubiert. Während des Schüttelns bilden sich MLV-PEG-Liposomen. Für die Herstellung der Liposomen/DNA-Komplexe wird in die Aqua dest. Phase die gewünschte DNA Konzentration hinzugefügt und wie beschrieben mit dem Lipidfilm geschüttelt. Dabei lagert sich die DNA zwischen die sich bildenden Lipiddoppelschichten.

Verwendete DNA:

- | | |
|------------------------|--|
| • Reporter-gen pUT 651 | kodiert das E. coli lacZ Gen (β-Galactosidase) CMV-Promoter |
| • Suizidgen pUT 649 | kodiert das Herpes simplex Virus-Thymidin Kinase CMV-Promoter |
| • Suizidgen pBS-CEA-tk | kodiert das Herpes simplex Virus-Thymidin Kinase CEA-Promoter |

Vorbereitung und Narkose der Versuchstiere:

Für alle tierexperimentellen Arbeiten werden die Ratten narkotisiert. Dafür werden sie ca. ½-1min in einen Ethertopf

gesetzt und bei einsetzender Immobilisation herausgenommen. Die Injektionsnarkotika werden über eine 1ml Mischspritze i.m. (Oberschenkelmuskulatur) appliziert. Erst nach vollständigem Einsetzen der anästhetischen und analgetischen Wirkung (nach ca. 10min) wird mit der weiteren Behandlung fortgefahren.

| Narkotika | Dosis |
|--|-------------|
| 1. Xylazin (Rompun®, 2%, Bayer AG, Leverkusen) | 12mg/kg KGW |
| 2. Ketaminhydrochlorid (Ketanest®, 50mg/ml, PARKE-DAVIS GmbH, Berlin) | 80mg/kg KGW |

Für operative Eingriffe werden die Ratten am Abdomen geschoren (Schermaschine). Die ausgebundenen und fixierten Tieren werden an der rasierten Fläche gereinigt und mit 70% Ethanol desinfiziert.

Zellaufbereitung der CC531 Zellen für die Tumordinokulation:

Aus der Zellkulturflasche wird das RPMI Medium abgesaugt und mit 3-4ml Trypsinlösung wird der Zellrasen kurz abgewaschen. Danach wird 1ml (25cm³ Zellkulturflasche) oder 1,5ml (75cm³ Zellkulturflasche) Trypsinlösung auf die Zellen gegeben und für 10min im Brutschrank inkubiert. Danach wird die Flasche herausgenommen und in 5ml (25cm³ Zellkulturflasche) bzw. 10ml (75cm³ Zellkulturflasche) RPMI Medium aufgenommen. Für die Auszählung der vitalen Zellen werden 50µl der Zellsuspension mit 50ml Trypanblau gefärbt (Lebend-Tod-Färbung). Tote Zellen färben sich auf Grund der erhöhten Zellpermeabilität blau an. Es werden in der Neubauer Zählkammer nur die vitalen Zellen gezählt und auf das gesamte Volumen umgerechnet.

Die Zellsuspension wird 2 mal bei 8000-1000Upm 3-5 min mit Phosphat gepufferte Saline (PBS) gewaschen und dann mit dem benötigten PBS-Volumen ($3 \times 10^5 / 100\mu\text{lPBS} / \text{Tier}$) aufgefüllt.

Inokulation der CC531 Zellen:

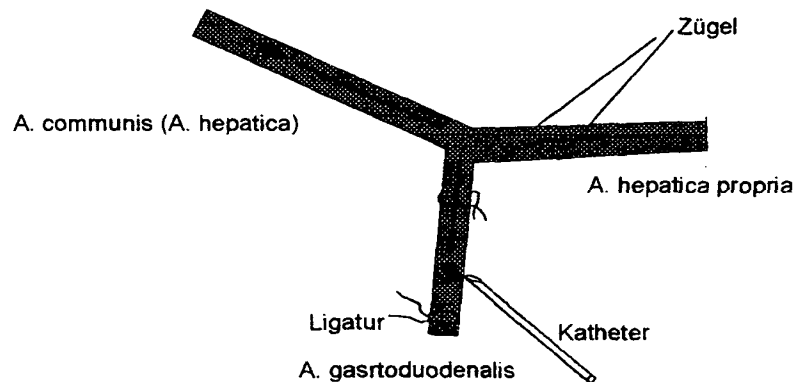
Den narkotisierten Ratten wird in der Linea alba, caudal des Xyphoides (ca. 2cm lang) das Abdomen eröffnet. Anschließend wird der linke Leberlappen hervorgelagert. Dazu wird eine

sterile, mit 0,9% igen NaCl-Lösung getränkte, Mullbinde (5cm x 5cm) verwendet, in dem der Leberlappen mit dem Mulltuch vorsichtig erfaßt und ca 3-4cm herausgezogen wird. Der vorgelagerte Leberanteil wird auf der Bauchdecke auf feuchte Mullkompressen gelegt. Über eine subkapsulären Einstich in den linken Leberlappen (Kanüle: 27G x $\frac{3}{4}$ "', Nr.20, 0,4 x 20mm, TERMUO, Madrid) wird langsam die frisch aufbereitete Zellsuspension injiziert (3×10^5 vitale Tumorzellen in 100 μ l PBS pro Tier). Beim Herausziehen der Kanüle wird mit einem Wattestäbchen der Einstichkanal abgedrückt, um das Abfließen der Zellsuspension zu verhindern. Mit einem Tropfen Gewebekleber (Histoacryl®, B. Braun Surgical GmbH, Meslungen) wird dann die Einstichsöffnung verschlossen und das Wattestäbchen kann entfernt werden. Der Leberlappen wird wieder vorsichtig in die Bauchhöhle zurückgelagert und die Bauchdecke wird zugenäht.

10-14 Tage nach der Tumorinokulation ist ein tastbarer (ca. 1cm³) Tumor in der Leber gewachsen.

Intraarterielle Applikation der DNA/Liposomen-Komplexe:

Den narkotisierten Ratten wird parallel zu den Rippenbögen, caudal des Xyphoides, ca. 5-6cm lang, das Abdomen eröffnet. Mit Hilfe von angefeuchteten Mullkompressen werden die Leberanteile nach cranial und die Darmanteile nach caudal gedrängt, so daß die tieferen Regionen ohne Hindernis betrachtet werden können. Die weiteren Schritte erfolgen unter mikrochirurgischen Bedingungen. Unter Sicht des Mikroskopes 5-8 facher Vergrößerung werden die A. communis (A. hepatica), A. gastroduodenalis und A. hepatica propria freipräpariert.



Um die A. hepatica propria wird mit einem Seidenfaden (5/0, 1 metric, Perma-Hand® Seide, geflochten, ETHICON, Norderstedt) ein Zügel angelegt und die A. gastroduodenalis wird nach distal ligiert. Nahe an dem Abgang der A. communis wird um die A. gastroduodenalis ein Faden mit gelockertem Knoten gelegt und anschließend proximal der Ligatur arteriotomiert. Ein Katheter wird vorsichtig über diese Öffnung in das Gefäß eingebracht und weiter nach intravasal vorgeschoben. Der so platzierte Katheterschlauch wird mit dem vorgelegten Knoten einmalig fixiert. Über eine Kanüle am anderen Ende des Schlauches wird Ringerlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) unter Sichtkontrolle injiziert (ca. 0,2ml), um das korrekte Abfließen der Flüssigkeit und den Kathetersitzes im Gefäß zu kontrollieren. Danach erfolgt die Applikation der Liposomen/DNA-Komplexe (mit DCES) im Wechsel von 50µl Liposomen und $\frac{1}{2}$ min Blutfluß durch die A. communis (Lockerung des angezügelter Gefäßes). Nach vollständiger Injektion wird der Katheterschlauch nochmals mit Ringerlösung gespült (0,2-0,3ml) und aus dem Gefäß herausgezogen. Mit dem vorgelegten Knoten kann dann die A. gastroduodenalis proximal der Öffnung abgebunden werden. Danach werden die Mullkompressen entfernt und die Ratten werden weiter versorgt.

Behandlung der Ratten mit Ganciclovir:

5 Tage nach der intraarteriellen Applikation der Liposomen/DNA-Komplexe erfolgt eine 14 tägige Behandlung der Ratten mit Ganciclovir-Natrium (Cymeven® i.v., Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen). Dabei wird den Tieren 1 x täglich 100mg/kg KGW Ganciclovir intraperitoneal appliziert. Dafür werden die Ratten mit einer Hand im Nacken erfaßt und aus dem Käfig gehoben. Über eine 1ml Spritze mit einer sterilen Kanüle (27G x $\frac{3}{4}$ ", Nr.20, 0,4 x 20mm, TERMUO, Madrid) wird im Bereich der Mittellinie nach prüfender Aspiration in das Abdomen langsam injiziert.

Tötung der Versuchstiere und Blutentnahme:

Am Tag der Tötung werden die Ratten narkotisiert und nach dem Einsetzen vollständiger Analgesie und Anästhesie intracardial (i.c.) mit einer 1ml Spritze (Omnifix®-F, Einmalspritze, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) punktiert. Das einzelne Tier wird dabei in Rückenlage gebracht und auf der Höhe einer gedachten Verbindungslinie zwischen den beiden Ellenbogen so in den Thorax eingestochen, daß die Kanüle (25G x 5/8, 0,5 x 16mm) rechts des Sternums in kraniodorsaler Richtung geführt wird. Die Herzpunktion erfolgt bis zum Exitus des Tieres (ca. 4-6ml Vollblut).

Das gewonnene Blut wird für 1-2 Stunden bei Zimmertemperatur oder über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Der entstandene Blutkuchen wird dann vorsichtig von der Röhrchenwand gelöst und bei max. 3000UpM 5min zentrifugiert. Danach wird vorsichtig der Überstand (Serum) abgehebert und eventuell nochmals zentrifugiert, um Erythrozytenbeimengungen zu beseitigen. Das so gewonnene Serum wird dann tiefgefroren und bei -20°C gelagert.

Organentnahme und Aufbereitung:

Den toten Ratten wird das Abdomen und der Thorax geöffnet, und die benötigten Organe (Lebertumor, Leber, Niere, Bauchspeicheldrüse, Milz, Herz, Lunge, Lymphknoten (aus Darmgekröse und Achseln)) werden entnommen. Alle Organe werden

mit 2-Methylbutan (Roth, Karlsruhe) als Kältevermittler bei -40°C tiefgefroren und bei -70°C gelagert.

Bestimmung der Tumorgroße:

Die Tumorgroße wird nach der Formel $V = a \times b^2 / 2$ bestimmt, wobei a die größte und b die kleinste Tumorausdehnung bezeichnet. Die Tumordiameter werden bei jedem Tier zwei mal (Tag 10 und Tag 30) gemessen.

Serumuntersuchung:

Die gewonnen Serumproben werden mit dem veterinärmedizinischen Analysegerät Vet Test 8008 (IDEXX GmbH, Wörrstadt, Deutschland) auf 16 verschiedene Blutparameter untersucht (photometrische Messung). Dabei handelte es sich um folgende Substanzen und Enzyme:

| Substrate | intrazelluläre Enzyme | exkretorische Enzyme |
|--------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Albumin [g/dl] | Creatinkinase [mg/dl] | α -Amylase [IU] |
| Total Billirubin [mg/dl] | Aspartat-Aminotransferase [IU] | Lipase [IU] |
| Cholesterin [mg/dl] | Alanin-Aminotransferase [IU] | |
| Creatinin [mg/dl] | Lactat-Dehydrogenase [IU] | |
| BUN (Harnstoff) [mg/dl] | Alkalische Phosphatase [IU] | |
| Glukose [mg/dl] | γ -Glutamyl-Transferase [IU] | |
| Ammoniak [mg/dl] | | |

Herstellung der Gefrierschnitte:

Aus den tiefgefrorenen Organen (Leber, Lebertumor, Lunge, Niere Milz) werden am Kryotom (Kryostat von LEICA Instruments GmbH; Nußloch) 8-12 μ m dicke Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte werden auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasobjekträger aufgezogen und bei Raumtemperatur angetrocknet. Je nach weiterer Verwendung werden die Schnitte in 2% Paraformaldehydlösung bei 4°C 5min oder für 5min in eisgekühltem Aceton fixiert. Die Schnitte werden dann luftgetrocknet und bei -20°C gelagert oder gleich anschließend gefärbt.

Histologische Auswertung**Hämalaun-Eosin Färbung (Übersichtsfärbung):**

Für die histologischen Übersichtspräparate wird eine Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin angefertigt. Durch das Hämalaun nach MAYER werden basophile Zellstrukturen blau angefärbt (selektive blaue Kernfärbung). Für die Plasmafärbung wird mit dem Anilinfarbstoff Eosin Y rot gegengefärbt.

X-Gal Färbung:

Zur Lokalisation der transfizierten Zellen und zur Auswertung der erreichten Transfereffizienz nach Applikation des liposomalen pUT651 Plasmides werden die angefertigten Gefrierschnitte folgendermaßen gefärbt. Die paraformaldehydfixierten Gefrierschnitte werden 2 mal für 5-10min in PBS bei Raumtemperatur gewaschen und sofort in die frisch vorbereitete Inkubationslösung* überführt und 4-24h bei 37°C inkubiert (Entwicklung der Blaufärbung). Anschließend werden die Schnitte kurz in Aqua dest. gespült und ca. 30s-1min in Eosin inkubiert. Die Schnitte werden dann entwässert über die aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol und mit Eukitt® eingedeckelt.

*** X-Gal Inkubationslösung:**

| | | |
|------------|-------|---|
| für 80ml = | 84ml | 1,1mM MgCl ₂ (22,36mg in 100ml PBS(pH7,2)) |
| | 6ml | 50mM K ₃ [Fe(CN) ₆] (1,645g in 100ml H ₂ O) |
| | 6ml | 50mM K ₄ [Fe(CN) ₆] (2,112g in 100ml H ₂ O) |
| | 2,1ml | 20mg/ml X-Gal in N,N-Dimethylformamid |

Schematischer Versuchsablauf:

| | | |
|----------------------------|---------------------------|---|
| Tag 0 | Tumornokulation | 3 x 10 ⁵ vitale CC531 Zellen in 100µl PBS werden subkapsulär in die Leber gespritzt; |
| 10 - 14 Tage danach | | in der Leber ist ein 1cm ³ großer, solider Tumor gewachsen; |
| Tag 10 | intraarterielle OP | das liposomale DCES mit dem Suizidgen wird über die Leberarterie appliziert; |

beschrieben. Es werden 12µm dünne Gefrierschnitte angefertigt, mit 2% Paraformaldehydls. fixiert, gewaschen und über Nacht in vorbereiteter X-Gal-Lösung, bei 37°C inkubiert. Der blaue β-Galaktosidase-Farbkomplex ist im Bereich des Tumorrandsaumes deutlich zu erkennen. Das bedeutet, daß mit diesem System in der empfindlichen Wachstumszone des Tumors gezielt DNA transfiziert werden kann. Alle anderen Organe sind in der Regel nicht betroffen.

Beispiel 2:

Den tumortragenden Ratten wird am Tag 10 mit dem DCES pUT649 (10mg) appliziert. Während der Operation wird die Tumorgroße vermessen. 5 Tage danach ist die erwartete Transfektion des Suicidgenkonstruktes um den Tumor herum am stärksten und bei den Tieren wird die GCV Gabe begonnen (1 x täglich 100mg/kg KGW). Am Tag 30 werden die Tiere getötet. Anschließend erfolgt die Abmessung des Tumors, die Blut- und Organentnahme und die Aufarbeitung wie oben beschrieben. Es werden 12µm dünne Gefrierschnitte angefertigt, mit 2% Paraformaldehydls. fixiert, gewaschen und mit der Hämatoxylin/Eosin-Färbung angefärbt. Die Auswertung zeigte eine statistisch signifikante Verkleinerung der Lebermetastasen im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Es ist keine vollständige Tumorregression feststellbar gewesen.

(siehe Diagramm im Anhang)

Beispiel 3:

Den tumortragenden Ratten wird am Tag 10 mit dem DCES pUT649 (20mg) appliziert. Während der Operation wird die Tumorgroße vermessen. 5 Tage danach ist die erwartete Transfektion des Suicidgenkonstruktes um den Tumor herum am stärksten und bei den Tieren wird die GCV Gabe begonnen (1 x täglich 100mg/kg KGW). Am Tag 30 werden die Tiere getötet. Anschließend erfolgt die Abmessung des Tumors, die Blut- und Organentnahme und die Aufarbeitung wie oben beschrieben. Es werden 12µm dünne Gefrierschnitte angefertigt, mit 2% Paraformaldehydls. fixiert, gewaschen und mit der Hämatoxylin/Eosin-Färbung

angefärbt. Die Auswertung zeigt eine statistisch signifikante Verkleinerung der Lebermetastasen im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Es ist keine vollständige Tumorregression feststellbar.

(siehe Diagramm im Anhang)

Beispiel 4:

Den tumortragenden Ratten wird am Tag 10 mit dem DCES pBS-tk (10mg) appliziert. Während der Operation wird die Tumorgröße vermessen. 5 Tage danach ist die erwartete Transfektion des Suicidgenkonstruktes um den Tumor herum am stärksten und bei den Tieren wird die GCV Gabe begonnen (1 x täglich 100mg/kg KGW). Am Tag 30 werden die Tiere getötet. Anschließend erfolgt die Abmessung des Tumors, die Blut- und Organentnahme und die Aufarbeitung wie oben beschrieben. Es werden 12µm dünne Gefrierschnitte angefertigt, mit 2% Paraformaldehydlsq. fixiert, gewaschen und mit der Hämatoxylin/Eosin-Färbung angefärbt. Die Auswertung zeigt, dass auf Grund des schwächeren Promoters auch keine statistisch signifikante Verkleinerung der Lebermetastasen im Vergleich mit der Kontrollgruppe erreicht werden kann.

(siehe Diagramm im Anhang)

Abkürzungen

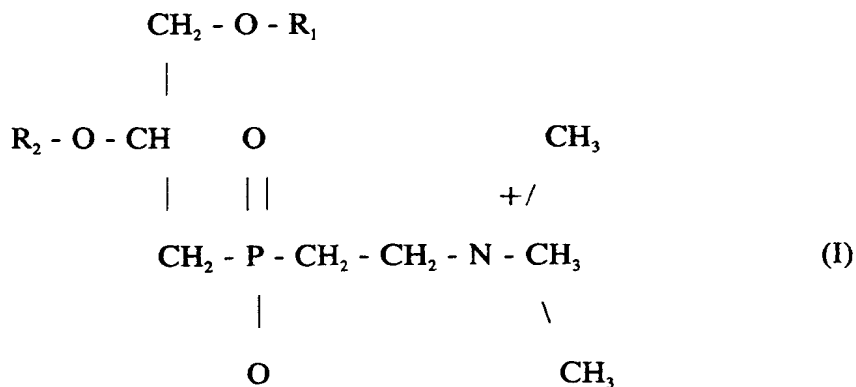
| | |
|----------|---|
| CEA | Promoter des Carcino-Embryonic Antigen |
| CMV | Promoter des Cytomegalovirus |
| DCES | Drug Carrier Embolisat System |
| HSV-tk | Herpes Simplex Virus-thymidin kinase |
| i.a. | intraarteriell |
| i.p. | intraperitoneal |
| KGW | Körpergewicht |
| lacZ gen | Reportergen, codiert die β -Galaktosidase |
| MLV-PEG | multilamellar vesicles-polyethylenglycol |
| OP | Operation |

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Mittel umfassend
 - eine oder mehrere unverkapselte oder in PEG-, Immuno-, Immuno/PEG-, kationischen, ggf. Polymer-modifizierten, Liposomen verkapselte genetische Materialien,
 - lyophilisierte oder abbaubare Stärkepartikel und/oder Gelatine und/oder Polymerpartikel, wie z.B. Nanopartikel und
 - jod-, gadolinium-, magnetit- oder Fluor-haltige Kontrastmittel.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als genetische Materialien DNA, RNA, Ribozyme, Antisense-Oligonukleotide enthält.
3. Mittel nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es als genetische Materialien Therapiegene, wie z.B. Suizidgene, Zytokingene, Chemokingene (MIP1 α , MCP) Antiangiogenesegene, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Apoptosegene, wie z.B. Apoptin, Natural born Killer (NbK), ggf. in Kombination mit Markergenen, wie z.B. Green Fluorescence Protein (GFP), Galactosidasegen (LacZ) unter ggf. induzierbaren, ggf. gewebespezifischen Promotoren, enthält.
4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich die DNA dichter packende Proteine wie Nuclear Capsid Protein (NCP 7), HMG und/oder synthetische Substanzen, wie z.B. Polyethylenimin, Poly-L-Lysin oder Protaminsulfat enthält.
5. Mittel nach einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß es die Suizidgene Herpes simplex Virus Thymidinkinasegen (HSVtk), Deaminasegen, NR/CB1954, Pyrin Nukleosid

Phosphorylase und/oder die Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 und/oder IL-15 enthält.

6. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5
dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen aus einem
 - a) natürlichen, halbsynthetischen oder vollsynthetischen Amphiphil
 - b) einem Steroid,
 - c) einer geladenen Lipidkomponente,
 - d) dem wasser- oder lipidlöslichen genetischen Material und/oder
 - e) einer Trägerflüssigkeit und ggf. zusätzlichen Hilfsstoffen bestehen.
7. Mittel nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet, daß die Mengenverhältnisse a.b:c im Molverhältnis 1:0,3:0,1 bis 1:1:0,1 oder bis 1:1:0,5 und c:d im Molverhältnis 2:1 bis 10:1 sind.
8. Mittel nach einem der Ansprüche 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) das natürliche, halbsynthetische oder vollsynthetische Amphiphil ein Lipid, Tensid, Emulgator, Polyethylenglykol (PEG) oder Lipid-PEG ist.
9. Mittel nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) das Amphiphil eine Verbindung der allgemeinen Formel I ist



worin R_1 und R_2 = C_{10} - C_{20} - Alkanoyl, - Alkenoyl, - Alkyl, -Alkenyl bedeuten.

10. Mittel nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß
 - b) das Steroid Cholesterol, Diethoxycholesterol oder Sitosterol ist.
11. Mittel nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß
 - c) die geladene Lipidkomponente das Anion des Dicetylphosphats, der Palmitinsäure, der Stearinsäure, das Anion eines Phospholipids, wie z.B. Phosphatidylserin, Phosphatidsäure oder das Anion eines Sphingolipids, wie z.B. Sulfatid, oder Polyethylenglykol (PEG), wie z.B. MPEG-DSPE, ist.
12. Mittel nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die geladene Lipidkomponente fluoriert ist.
13. Mittel nach einem der Ansprüche 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß als zusätzliche Hilfsstoffe
 - e) Polymerpartikel in Form einer 25 %igen wäßrigen Lösung von Poloxamer eingesetzt werden.
14. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die genetischen Materialien in
 - SUV (Small unilamellar vesicles)-PEG- Liposomen,
 - LUV (Large unilamellar vesicles)-PEG- Liposomen,
 - REV (Reversed face evaporation vesicles)-PEG-Liposomen,
 - MLV (Multilamellar vesicles)-PEG-Liposomen,
 - Anti-Ki-67-Immun-PEG-Liposomen,
 - Anti-CEA-PEG-Liposomen oder
 - PEG DAC-Chol-Liposomen vorliegen.
15. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß

die Stärkepartikel lyophilisiert vorliegen in einer Größe von 40-90 μm und sie sich in physiologischer Kochsalzlösung in der Konzentration von 5 bis 70 mg/ml befinden.

16. Mittel nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Stärkepartikel eine Korngröße von 60 bis 90 μm
aufweisen.
17. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 16,
dadurch gekennzeichnet, daß
absorbierbares Gelatinepuder enthalten ist.
18. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 17,
dadurch gekennzeichnet, daß es als jodhaltiges
Kontrastmittel ein- oder mehrfach jodierte Phenylderivate
enthält.
19. Mittel nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet, daß es Iopromid, Ioxitalamat,
Ioxaglat, Iopamidol, Iohexol, Iotralon, Metrizamid oder
Ultravist enthält.
20. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 19,
dadurch gekennzeichnet, daß
es als Kontrastmittel fluorierte Lipide enthält.
21. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 20,
dadurch gekennzeichnet, daß
es 30 bis 90 mg lyophilisierte oder abbaubare
Stärkepartikel und 5 bis 100 mg verkapseltes oder
unverkapseltes genetisches Material enthält.
22. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 17 und 20 bis 21,
dadurch gekennzeichnet, daß es
 - Markergen LacZ und Suizidgen pUT HSVtk,
 - verkapselt in MLV-PEG,

- Stärkepartikel Spherex oder Gelfoam und
 - ein fluoriertes Kontrastmittel enthält.
23. Verfahren zur Herstellung eines Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß man 30 bis 90 mg lyophilisierte oder abbaubare Stärkepartikel und/oder Gelatine und/oder Polymerpartikel in 3 bis 6 ml Kontrastmittel löst und danach die therapeutisch notwendige Menge eines genetischen Materials zusetzt.
24. Verfahren zur Herstellung eines Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß man die therapeutische Menge eines genetischen Materials und ggf. ein komplexierendes Agens in einem oder mehreren Lipiden löst und mit Stärkepartikeln und einem Kontrastmittel versetzt.
25. Verwendung von einem Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 22 zum Gentransfer und zur Gentherapie, insbesondere zur Therapie von Lebermetastasen, Tumoren der Lunge, Blase, Kopf und Hals, Urogenitalien, Lymphknoten, Mamma, bei Glioblastomen, Arthritis und Asthma.
26. Verwendung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Mittel zur lokalen Gentherapie verwendet wird.
27. Verwendung nach Anspruch 25 oder 26 dadurch gekennzeichnet, daß das Mittel zur intraarteriellen Therapie von Lebermetastasen verwendet wird.
28. Verwendung von einem Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 22 zur Behandlung von neurodegenerativen und Autoimmunerkrankungen.
29. Verwendung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß

das Mittel bei Parkinsonscher, Alzheimer Kkkrankheit und Multipler Sklerose verwendet wird.

30. Verwendung nach Anspruch 28,
dadurch gekennzeichnet, daß
das Mittel bei Diabetes Typ I verwendet wird.
31. Verwendung von einem Mittel gemäß einem der Ansprüche 1
bis 22 zur Begleitung von Transplantationen
32. Verwendung von einem Mittel gemäß einem der Ansprüche 1
bis 22 zur Restenosebehandlung.
33. Verwendung nach Anspruch 32,
dadurch gekennzeichnet, daß
das Mittel bei Bluthochdruck verwendet wird.

1/1

Mittleres Tumorstadium vor und nach der Gentherapie

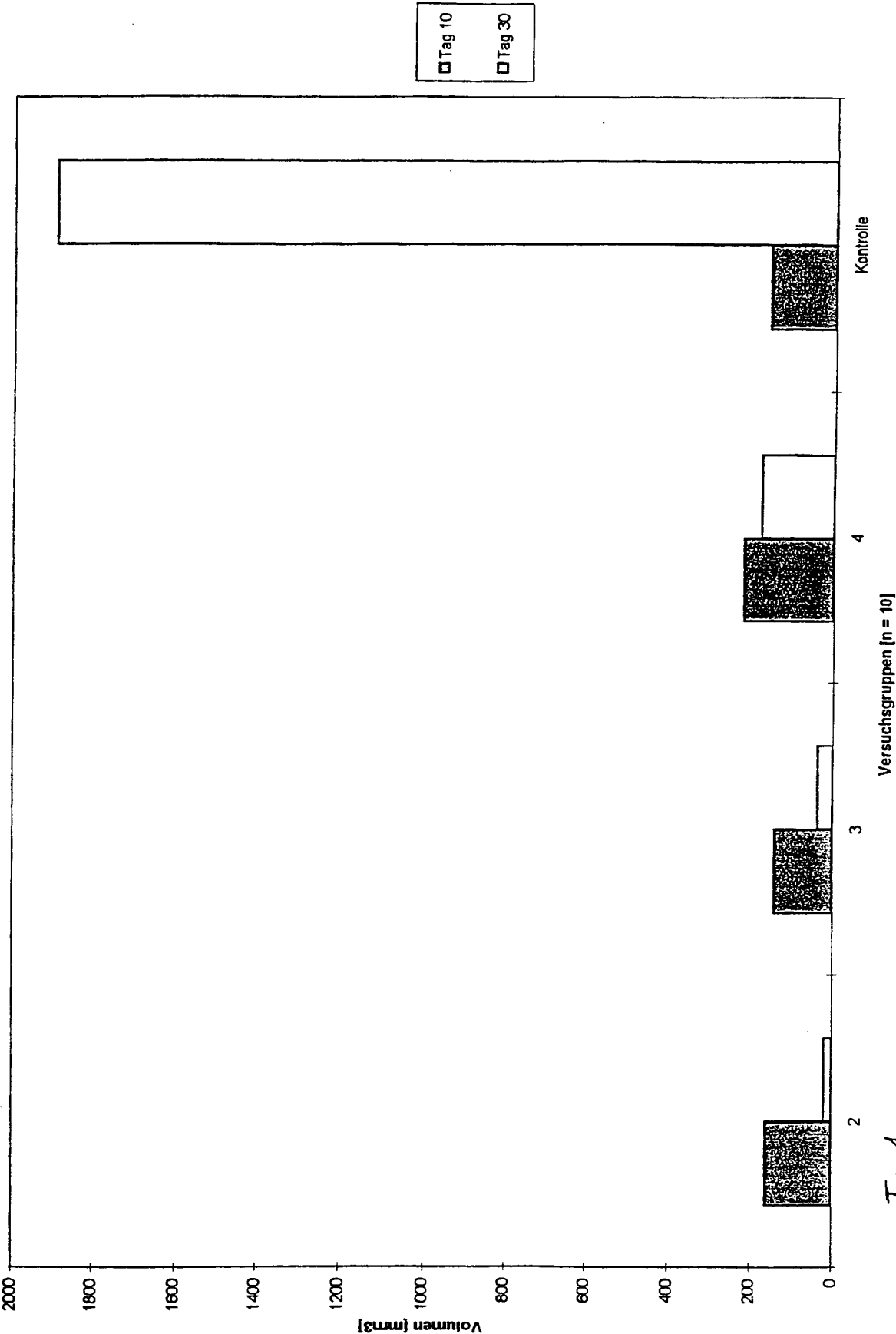
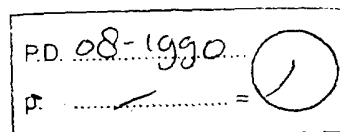


Fig. 1

1
2
3

4
5
6
7

XP-002106973



AN 90358589 MEDLINE
DN 90358589
TI Chemoembolization combined with hepatic arterial induction of
endogenous TNF and anticancer agents for hepatocellular carcinoma--a
case report.
AU Takekoshi H
CS Dept. of Internal Medicine, Tokyo Saiseikai Central Hospital..
SO GAN TO KAGAKU RYOH [JAPANESE JOURNAL OF CANCER AND CHEMOTHERAPY],
(1990 Aug) 17 (8 Pt 2) 1744-7.
Journal code: 6T8. ISSN: 0385-0684.
CY Japan
DT Journal; Article; (JOURNAL ARTICLE)
LA Japanese
FS Priority Journals; Cancer Journals
EM 199011
AB Antitumor effect of TNF has been demonstrated to be increased with
some kinds of anticancer agents. We reported antitumor effect of
hepatic endogenous TNF induced with gamma-IFN and OK-432 for
hepatocellular carcinoma (HCC). To increase antitumor effect of
transcatheter arterial embolization (TAE), hepatic arterial
chemoembolization was performed with a mixture of gamma-IFN, OK-432
and gelatin sponge following a mixture of Doxorubicin and iodized
oil (LPO) on the first time. Serum alpha-fetoprotein decreased from
18,903 ng/ml to 470 ng/ml but elevated three months after these
procedures. Following the above procedure, hepatic arterial
embolization with a mixture of gelatin sponge and Actinomycin D as
an inhibitor of RNA was given the second time. Serum
alpha-fetoprotein decreased under 5 ng/ml and computed tomography
revealed decreased tumor size and low density area following this
second procedure. Hepatic arterial chemoembolization with a mixture
of hepatic induction of endogenous TNF and anticancer agents may
well be beneficial for survival of patient with HCC.
CT Check Tags: Case Report; Human; Male
Aged
*Antineoplastic Agents, Combined: AD, administration & dosage
*Biological Products: AD, administration & dosage
*Carcinoma, Hepatocellular: TH, therapy
Dactinomycin: AD, administration & dosage
Delayed-Action Preparations
Doxorubicin: AD, administration & dosage
Drug Administration Schedule
*Embolization, Therapeutic
English Abstract
Gelatin Sponge, Absorbable: AD, administration & dosage
Hepatic Artery
Infusions, Intra-Arterial
*Interferon Type II: AD, administration & dosage
Iodized Oil: AD, administration & dosage
*Liver Neoplasms: TH, therapy
*Picibanil: AD, administration & dosage
*Tumor Necrosis Factor: PH, physiology
RN 23214-92-8 (Doxorubicin); 39325-01-4 (Picibanil); 50-76-0
(Dactinomycin); 8001-40-9 (Iodized Oil); 82115-62-6 (Interferon Type
II)
CN 0 (Antineoplastic Agents, Combined); 0 (Biological Products); 0
(Delayed-Action Preparations); 0 (Gelatin Sponge, Absorbable); 0
(Tumor Necrosis Factor)

